

## 非人灵长类基因修饰模型研究进展

刘真, 蔡毅君, 孙强

中国科学院神经科学研究所 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心 神经生物学国家重点实验室 中国科学院灵长类神经生物学重点实验室, 上海 200031

刘真, 蔡毅君, 孙强. 非人灵长类基因修饰模型研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(10): 1665-1673.

Liu Z, Cai YJ, Sun Q. Advance of gene-modified non-human primate models. Chin J Biotech, 2017, 33(10): 1665-1673.

**摘 要:** 非人灵长类动物在生命科学基础研究和生物医药研究领域具有非常重要的地位。近年来随着慢病毒载体转染及靶向核酸酶 (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) 等基因操作技术的出现, 科学家们成功地获得了外源基因过表达的转基因猴和目的基因定点切割的基因编辑猴。文中对目前利用慢病毒载体获得转基因猴和利用靶向核酸酶获得基因编辑猴的研究进展进行了综述, 并讨论了基因修饰猴的嵌合体现象、脱靶现象及非人灵长类动物较长性成熟时间这几个影响非人灵长类基因修饰模型推广应用的要素, 最后展望了非人灵长类基因修饰模型构建技术的研究热点及发展趋势。

**关键词:** 非人灵长类, 基因修饰, 慢病毒载体, 靶向核酸酶

## Advance of gene-modified non-human primate models

Zhen Liu, Yijun Cai, and Qiang Sun

State Key Laboratory of Neuroscience, Key Laboratory of Primate Neurobiology, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Institute of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

**Abstract:** Non-human primates would be particularly valuable in life sciences and biomedical research area. Gene-modified monkeys with gene overexpression or loss of function have been successfully generated with the rapid advance in gene manipulation technology such as lentivirus infection and programmable nucleases (ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9). Here we review the recent development on gene-modified monkey generation by lentivirus and programmable nucleases. Then we discuss three concerns, the long time for sexual maturation, the off target and the

**Received:** May 5, 2017; **Accepted:** June 28, 2017

**Supported by:** Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2014BAI03B00).

**Corresponding author:** Qiang Sun. Tel: +86-21-54921757; E-mail: qsun@ion.ac.cn

国家科技支撑计划 (No. 2014BAI03B00) 资助。

网络出版时间: 2017-08-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170804.1028.001.html>

mosaicism of founders, which limit the wide application of gene-modified non-human-primates. At last, hotspots and future trend for gene-modified non-human-primates generation are proposed.

**Keywords:** non-human primate, gene-modified, lentivirus, programmable nucleases

基因修饰动物模型在生命科学研究中发挥着极其重要的作用。其中大小鼠是哺乳类中最常用的模式动物，也是基因修饰手段应用最成熟的物种。利用慢病毒载体、转座子、胚胎干细胞以及靶向核酸酶等基因操作手段，科学家们可以构建各种携带转基因、基因敲除和基因敲入等基因修饰的大小鼠动物模型。这些动物模型被广泛应用到免疫学、发育生物学、肿瘤学、神经生物学、心血管疾病等各个领域，为人们理解生命现象的本质作出了巨大的贡献。尽管如此，利用大小鼠作为动物模型仍然有很多局限性，尤其是在神经科学认知研究领域，大小鼠很难有类似人的高级认知功能。另外绝大多数利用模拟人类脑疾病的大小鼠模型开发的药物也都以失败告终。

非人灵长类动物，指除人以外的所有灵长类动物，作为最接近于人的模式动物，其在基础研究和生物医药研究领域有重要的地位<sup>[1]</sup>。相比于大小鼠等啮齿类哺乳动物，非人灵长类与人类有着更多相似的生物学特征，被认为是研究高等认知以及脑疾病的最理想的模式动物。因此，国际科学界很早就对非人灵长类高度重视，并建立了很多非人灵长类研究中心。目前非人灵长类的实验动物主要包括隶属于旧大陆猴分支猕猴属的食蟹猴 *Macaca fascicularis* 和恒河猴 *Macaca mulatta* 及新大陆猴分支的绒猴 *Marmosets*。随着转基因技术和基因编辑技术的发展，科学家们已经可以成功地对非人灵长类的基因组进行基因修饰，获得外源基因过表达

的转基因猴和目的基因定点切割的基因编辑猴。我们国家的非人灵长类资源非常丰富，全国各地有多个非人灵长类动物饲养繁殖基地。国家对利用非人灵长类开展科学研究也非常重视，即将开始的中国脑计划中，非人灵长类动物将会发挥非常重要的作用。

慢病毒载体感染和分子靶向核酸酶 (ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 等) 是非人灵长类基因修饰模型构建中最常用的两种方法。利用这两种方法获得的首建动物 (F0) 有可能是嵌合体，这导致科学家们很难在 F0 代得到基因型和表型一致的动物模型。传代到 F1 可以有效解决嵌合体问题，但常用的恒河猴和食蟹猴正常性成熟时间至少需要 4 年，加上半年的怀孕期，即至少需要 4.5 年才能得到 F1 代。这严重限制了基因修饰恒河猴和食蟹猴模型的推广和应用。

本文中，我们将对基因修饰非人灵长类模型的构建进行综述，并对限制非人灵长类基因修饰模型推广应用的因素展开讨论，最后对非人灵长类基因修饰模型构建技术的研究热点及发展趋势进行展望。

## 1 慢病毒载体介导的非人灵长类转基因技术研究进展

在生殖生理特性方面，食蟹猴和恒河猴都是有月经单胎繁殖动物，即每个经期排卵 1-2 枚。由于存在优势卵泡效应，即使是用激素对其进行超数排卵 (超排) 处理，自然受孕一般也只有 1-2 枚卵母细胞排出并受精。因此，用于大小鼠

通过直接取受精卵后进行转基因操作的方法在非人灵长类上并不适用。同时,由于既没有足够的卵巢用于收集成熟前卵母细胞,也没有建立一种可靠的卵母细胞体外成熟体系,诸如在牛和猪等动物上通过体外成熟获得卵母细胞资源的方法在非人灵长类上也不可行。在非人灵长类基因修饰模型构建中,要得到更多卵母细胞用于胚胎构建,需通过对动物进行超排处理使卵巢中多数卵泡生长,并在自发排卵前将更多发育的卵泡内成熟卵母细胞取出来实现。但即便如此,卵母细胞和胚胎资源还是有限,因此,为充分利用有限的胚胎资源,必须建立高效的转基因或基因编辑技术。

2001年,Chan等利用高滴度的慢病毒转染早期恒河猴卵母细胞后再进行单精子注射和胚胎移植,成功得到了转GFP的恒河猴ANDi<sup>[2]</sup>。虽然在其得到的3只出生个体中仅有1只检测到了外源基因GFP的整合和嵌合表达,但这一开创性的工作标志着转基因非人灵长类技术的诞生。同年7月,Wolfgang等同样利用慢病毒载体转染恒河猴囊胚期胚胎后移植,也得到了在胎盘组织中整合了外源eGFP的转基因恒河猴<sup>[3]</sup>。这两个开创性的工作说明转基因非人灵长类技术已经实现了从理想到现实的转变。但他们都选择绿色荧光蛋白作为转入的目标基因,其主要目的还是用来探讨转基因非人灵长类技术的可行性。随着研究的深入和技术的成熟,科学家们开始把目标转向了功能基因。2008年该技术才终于在非人灵长类模式动物构建上得以成功应用,Yang等利用该技术将亨廷顿舞蹈症的致病基因成功导入到恒河猴体内,并得到了具有类似亨廷顿舞蹈症表型的动物模型<sup>[4]</sup>。亨

廷顿疾病是一种显性的神经性病变疾病,主要是因为人亨廷顿基因(HTT)第一个外显子中CAG重复扩增,导致表达的亨廷顿蛋白中含有多聚谷氨酰胺,从而引发运动机能损伤、认知功能退化和精神失调等一系列病症,患者发病10-15年后就会死亡。虽然啮齿类也有亨廷顿疾病转基因动物模型,但这些模型都不能很好地模拟亨廷顿疾病在人体的表型特征。在亨廷顿转基因恒河猴的工作中,作者把人HTT基因的第二个外显子上后面链接84个CAG重复序列,并把这段重组序列包装到慢病毒载体中,得到高滴度的慢病毒颗粒(滴度 $>10^9$  PFU/mL)。通过卵母细胞透明带下注射把病毒粒子注射到恒河猴MII期卵母细胞的卵周隙。之后,再通过单精注射让卵母细胞受精和胚胎移植,成功得到转基因恒河猴。分析结果显示转基因猴不仅表达了外源基因,而且出现了神经纤维网聚集、核内含物,同时,表现出肌无力和舞蹈症等亨廷顿舞蹈症病人的典型标志表型。作为第一个非人灵长类疾病动物模型,亨廷顿疾病转基因恒河猴模型的意义之大是不言而喻的。该模型可以让人们更好、更深入地了解亨廷顿疾病,研究其发病机制和致病机理,从而研发出相对应的治疗方案和药物。同时,该模型的建立也证明了构建其他非人灵长类疾病模型的可行性。其后,2009年日本科学家Sasaki等利用绒猴性成熟时间相对较短的特性,通过慢病毒载体转染技术成功得到了可生殖系传递的GFP转基因绒猴<sup>[5]</sup>。我国虽然在非人灵长类辅助生殖和转基因技术上起步较晚,但是经过近10年的发展已经逐渐赶上并超过了美国、日本等国,处于世界领先地位。2008年华东师范大学报道了国内首例试管食蟹

猴<sup>[6]</sup>；2010年中国科学院昆明动物研究所报道了国内首例转基因猴<sup>[7]</sup>；2011年中国科学院神经科学研究所利用该技术将人的自闭症相关致病基因 MeCP2 成功转入食蟹猴个体，得到了多只 MeCP2 转基因食蟹猴首建猴，并利用精巢移植技术提早得到了 F1 代转基因猴，经过全面系统分析发现这些 MeCP2 转基因食蟹猴有类似人类自闭症表型<sup>[8]</sup>。

## 2 靶向核酸酶介导的非人灵长类基因编辑研究进展

通过慢病毒载体介导得到的非人灵长类转基因技术只能完成外源基因的过表达操作，致其应用范围有限。由于在非人灵长类上还未建立可生殖系整合的猴胚胎干细胞系，因此还不能像通过胚胎干细胞基因打靶操作获得基因敲除小鼠模型那样来构建基因敲除猴模型。近年来，随着锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和 RNA 介导的基于成簇的规律间隔的短回文重复序列和 Cas9 蛋白的 DNA 核酸内切酶 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas9-based RNA-guided DNA endonucleases, CRISPR/Cas9) 这 3 种靶向核酸酶技术的出现及其在模式动物构建上的应用<sup>[9-16]</sup>，使得我们可以跨过非人灵长类无胚胎干细胞用于进行同源重组基因打靶的这一技术障碍，直接通过早期猴胚胎期注射用于靶向特定基因的 ZFN、TALEN 或 Cas9/sgRNA 对靶基因进行编辑，进而获得相应靶基因突变的猴模型。2014 年，来自昆明理工大学和中国科学院神经科学研究所的两个团队分别通过受精

卵注射靶向食蟹猴 Mesp2 基因的 TALEN 质粒和 mRNA 得到了 Mesp2 基因突变食蟹猴<sup>[17-18]</sup>。Mesp2 是一个位于 X 染色体上的纯合突变致死基因，该基因突变的病人会发生瑞特氏综合征。随后南京大学、南京医科大学和昆明理工大学联合报道了使用 CRISPR/Cas9 技术获得了基因编辑的食蟹猴。该工作通过将针对 Ppar- $\gamma$ 、Rag1 和 Nr0b1 三个基因的 5 条 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合注入食蟹猴受精卵的卵胞质并将注射后的胚胎移植到代孕受体，最后得到了两只 Ppar- $\gamma$  和 Rag1 基因编辑的个体<sup>[19]</sup>。之后，中国科学院动物研究所的团队报道了利用 CRISPR-Cas9 技术获得了 p53 基因双等位基因突变的食蟹猴<sup>[20]</sup>。2015 年，中国科学院遗传与发育生物学研究所和昆明理工大学联合报道了 DMD 基因编辑恒河猴<sup>[21]</sup>。2016 年，日本科学家利用 ZFN 和 TALEN 成功获得了 IL2RG 基因编辑绒猴<sup>[22]</sup>。至此，过表达和基因编辑这两项主要的模式动物构建技术在非人灵长类的主要物种恒河猴、食蟹猴和绒猴上都获得了成功。

## 3 限制非人灵长类基因修饰模型推广应用的因素

无论是利用慢病毒载体转染获得的转基因猴还是利用靶向核酸酶获得的基因编辑猴，其首建猴多数都以嵌合体的形式存在。对于存活的嵌合体首建猴，我们很难精确地将转基因或目的基因突变和潜在表型对应起来。因此，利用这些方法得到的嵌合体首建猴，并不能称之为标准的动物模型。

在利用慢病毒载体构建转基因猴时，不同数目的慢病毒载体基因组可以在早期胚胎多个

时间点整合到猴基因组，其整合数目和整合时间呈一定的随机性。这就导致注射同一批病毒载体的不同胚胎发育得到的个体的转基因拷贝数及转基因整合位点差别有可能很大，而且同一只转基因个体其体内不同细胞所含有的转基因数目和整合位点也有可能不同。那么利用相同的慢病毒获得的同批转基因首建猴就可能会出现表型的差异。在我们利用慢病毒构建 *Mecp2* 转基因食蟹猴的工作中，对获得的 10 只转基因阳性首建猴的转基因拷贝数进行分析，发现转基因猴中，最少含有 1 个转基因拷贝数，而最多则含有 7 个转基因拷贝数。我们利用其中 1 只含有 6 个 *Mecp2* 转基因数的雄性首建猴进行传代，获得了 5 只 *Mecp2* 转基因 F1 代食蟹猴。分析发现这 5 只 F1 代的 *Mecp2* 转基因拷贝数从 2–6 不等<sup>[8,23]</sup>。这既可能是由于 F1 代的基因分离所导致的，也可能是由于 *Mecp2* 转基因首建猴生殖细胞为转基因嵌合体所导致的。虽然每只 F1 代转基因食蟹猴体内含有不同的 *Mecp2* 拷贝数，但是可以肯定的是每只 F1 代的个体内不同组织和细胞含有的转基因拷贝数目及整合位点是一致的，即 F1 代转基因食蟹猴不是以嵌合体存在。利用 F1 代转基因猴作为动物模型获得的结果会更具有说服力。

在利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等靶向核酸酶来进行基因编辑猴构建时，获得的首建猴基本上也都以嵌合体形式存在<sup>[24]</sup>。这是因为靶向核酸酶在对目的打靶序列实现双链切割后，切割断裂后的 DNA 多数会以非同源末端连接来进行修复，修复后的目的打靶序列会出现各种形式的基因突变，从而可能导致该基因功能的失活。注射针对同一打靶位点的靶向核酸

酶，获得的同一批首建猴很可能含有不同的目的基因突变序列，同一只首建猴体内的不同组织细胞内也会有不同形式的目的基因突变序列。另外不同基因编辑首建猴体内也往往会含有不同比例的野生型序列。在我们利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术获得的多个基因编辑首建猴模型中，我们发现基本所有的首建猴都是以嵌合体形式存在，即使有的首建猴体内没有检测到野生型序列，该首建猴也包含有不同形式的突变型序列。嵌合现象的存在使我们很难判断该靶基因在不同细胞组织中是否真正失活，所以从实验动物的角度来说，获得的首建猴我们只能称之为基因编辑猴，而不能称之为基因敲除猴。由于每个生殖细胞只能获得一种突变型，通过 F0 代基因编辑首建猴与野生型猴交配得到的子代猴 (F1 代) 将不会再有嵌合现象，如果 F1 代中含有使该基因失活的基因突变，那么我们可以称此 F1 代为杂合的基因敲除猴。因此通过 F0 代基因编辑首建猴直接互配，就有机会获得真正的 (F1 代) 基因敲除猴。考虑到非人灵长类较长的性成熟时间及靶向核酸酶技术应用于非人灵长类基因编辑模型构建才 3 年左右的时间，目前未见真正的 F1 代基因敲除猴报道。

利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等靶向核酸酶来进行基因编辑猴构建存在的另外一个问题就是脱靶现象<sup>[24]</sup>。在使用 CRISPR/Cas9 构建基因编辑动物模型时，脱靶现象尤为突出。前文中提到的已经报道的多个基因编辑猴都没有检测到脱靶现象的存在，但由于检测位点数目的限制，很难说这些首建基因编辑猴就没有脱靶突变发生。在我们通过 CRISPR/Cas9 技术获得的多批基因编辑首建猴中都检测到了脱靶

突变。因此，脱靶现象的存在也是潜在的限制基因编辑首建猴作为动物模型开展深入研究不可回避的因素之一。

无论是首建猴的嵌合体现象还是脱靶现象，传代至 F1 代是将不同转基因或基因突变及脱靶突变分离进而获得真正的转基因或基因敲除动物模型的一个有效策略，但这还有一个性成熟时间长的问题无法回避。常用的恒河猴和食蟹猴其性成熟约需要 4-5 年的时间<sup>[25-27]</sup>。我们也针对苏州猴群的公猴进行了精液采集和精子检测，发现至少要 50 月龄以上的公猴精液中才会出现精子。针对这一障碍，我们开发了食蟹猴的精巢异种移植技术来加速其精子生成。通过将青少年食蟹猴精巢组织块移植到去势成年雄性裸鼠的背部，成功将食蟹猴的精子发生时间缩短到了 24 个月，并利用获得的精子进行胚胎构建和移植得到了健康的食蟹猴后代<sup>[23]</sup>。这将推动非人灵长类基因修饰模型在基础研究及生物医药研究中的应用。

#### 4 非人灵长类基因修饰模型构建技术研究热点及展望

基因编辑首建猴的嵌合体现象是影响其作为动物模型用于科学研究的一大障碍，除了传代至 F1 代以外，通过改进方法一步获得无野生序列嵌合现象的基因编辑首建猴，将提高利用基因编辑首建猴作为科学研究的可能性。根据我们的经验，当利用 CRISPR/Cas9 进行基因编辑猴构建时，其基因组内不同位点对于切割效率的影响非常大，有些位点可以利用 CRISPR/Cas9 对其实现高效切割，有些位点则很难被切割。所以首先筛选高效的 sgRNA 打靶位点，是利用

CRISPR/Cas9 获得基因编辑猴的重要因素。另外我们发现通过将多条 sgRNA 混合注射的方法，也可以明显提高获得无野生型序列嵌合的基因编辑首建猴。

另外针对脱靶，通过分析筛选脱靶效应低的 sgRNA 进行首建猴构建，或利用两条 sgRNA 及 Cas9 nickase 来对目的打靶位点的两条 DNA 链分别切割，可以潜在大大降低脱靶效应<sup>[28]</sup>。在非人灵长类上是否可以得到同样效果，还有待进一步的实验来验证。

无论是脱靶现象还是嵌合体现象，都可以通过传代来对不同基因型和脱靶突变进行分离。由于非人灵长类性成熟周期非常漫长，那么研究缩短非人灵长类性成熟周期的方法进而实现繁殖加速将会推动非人灵长类研究应用。我们已经开发了食蟹猴的精巢异种移植来实现其繁殖加速，但是该方法技术复杂而且效率较低<sup>[23]</sup>。那么开发其他非人灵长类繁殖加速的方法也会是未来非人灵长类基因修饰模型的一个重要的研究方向。

尽管科学家们已经可以利用靶向核酸酶对非人灵长类目的基因进行定点切割，获得目的基因突变的基因编辑猴，然而目前还没有成功利用靶向核酸酶和外源同源片段通过同源重组来获得基因敲入猴<sup>[29]</sup>的报道。传统的方法是利用 CRISPR/Cas9 对目的序列插入位点进行切割及同源臂介导的同源重组来实现外源片段的插入，但是该方法总体效率偏低。目前在细胞和大小鼠水平，已经有多篇文章报道可以提升利用 CRISPR/Cas9 等靶向核酸酶介导的基因敲入。例如通过加入小分子抑制 NHEJ (非同源末端连接) 的发生，可以提高 CRISPR/Cas9 介导

的细胞或小鼠胚胎水平基因敲入的效率<sup>[30-31]</sup>；也有报道称将细胞同步化在特定细胞周期也可以提高 CRISPR/Cas9 介导的细胞水平的基因敲入<sup>[32]</sup>；通过 TALEN 及 CRISPR/Cas9 和短的同源臂介导的末端连接也能在细胞和胚胎水平提高外源片段精确敲入的效率<sup>[33]</sup>。值得一提的是，我们实验室与本所杨辉课题组合作的课题中，通过利用 CRISPR/Cas9 及 800 bp 同源臂介导的末端连接实现了高效的小鼠和食蟹猴胚胎水平的基因敲入<sup>[34]</sup>。尽管有多种方法提升基因敲入的效率，但是总体来说仍不理想，且获得的首建动物很有可能以嵌合体形式存在，可以判断即使利用此方法获得了阳性基因敲入猴，其距离作为真正的动物模型用于科学研究仍有较长的路要走。

在猴的精确基因敲入实现之前，想要在特定细胞类型内表达标记蛋白或功能蛋白（如光敏感通道蛋白等），利用腺相关病毒进行成体动物注射是一个折中的选择。2016 年剑桥大学 Stauffer 等首次报道利用包含特异启动子 THp 启动的 Cre 和包含 Cre 依赖的 ChR2 两种腺相关病毒混合注入恒河猴中脑，实现了通过外部光源特异性激活恒河猴中脑多巴胺能神经元的目的<sup>[35]</sup>。

在小鼠基因修饰模型构建中，除了慢病毒载体和靶向核酸酶以外，利用胚胎干细胞囊胚注射、体细胞核移植、单倍体干细胞及生殖干细胞介导的转基因等技术虽然不如以 CRISPR/Cas9 为代表的靶向核酸酶简单易行，但是这些方法都有各自的优势并且在小鼠水平都取得了成功<sup>[36-38]</sup>。而且利用以上方法可以获得携带复杂基因修饰的基因敲入首建动物模型。体细胞核移植、单倍体干细胞及生殖干细胞介导的转基因获得的首建动物更是没有嵌合体现象存在。但是目前

这些方法在非人灵长类都还没有获得成功。考虑到非人灵长类自身特点，此类方法在非人灵长类的应用研究也是非人灵长类基因修饰模型构建技术的一个重要的方向<sup>[39]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Belmonte JCI, Callaway EM, Caddick SJ, et al. Brains, genes, and primates. *Neuron*, 2015, 86(3): 617–631.
- [2] Chan AWS, Chong KY, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001, 291: 309–312.
- [3] Wolfgang MJ, Eisele SG, Browne MA, et al. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(19): 10728–10732.
- [4] Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 2008, 453(7197): 921–924.
- [5] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 2009, 459(7246): 523–527.
- [6] Sun Q, Dong J, Yang WT, et al. Efficient reproduction of cynomolgus monkey using pronuclear embryo transfer technique. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12956–12960.
- [7] Niu YY, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(41): 17663–17667.
- [8] Liu Z, Li X, Zhang JT, et al. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature*, 2016, 530(7588): 98–102.
- [9] Carroll D, Beumer KJ, Morton JJ, et al. Gene targeting in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*

- with zinc-finger nucleases. *Methods Mol Biol*, 2008, 435: 63–77.
- [10] Carbery ID, Ji DN, Harrington A, et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 451–459.
- [11] Geurts AM, Cost G J, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433.
- [12] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 23–24.
- [13] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695–696.
- [14] Chang NN, Sun CH, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472.
- [15] Shen B, Zhang J, Wu HY, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [16] Wang HY, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [17] Liu HL, Chen YC, Niu YY, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 323–328.
- [18] Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with *MECP2* mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull*, 2014, 30(3): 381–386.
- [19] Niu YY, Shen B, Cui YQ, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156(4): 836–843.
- [20] Wan HF, Feng CJ, Teng F, et al. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25(2): 258–261.
- [21] Chen YY, Zheng YH, Kang Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(13): 3764–3774.
- [22] Sato K, Oiwa R, Kumita W, et al. Generation of a nonhuman primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(1): 127–138.
- [23] Liu Z, Nie YH, Zhang CC, et al. Generation of macaques with sperm derived from juvenile monkey testicular xenografts. *Cell Res*, 2016, 26(1): 139–142.
- [24] Guo XY, Li XJ. Targeted genome editing in primate embryos. *Cell Res*, 2015, 25(7): 767–768.
- [25] Luetjens CM, Weinbauer GF. Functional assessment of sexual maturity in male macaques (*Macaca fascicularis*). *Regul Toxicol Pharmacol*, 2012, 63(3): 391–400.
- [26] Smedley JV, Bailey SA, Perry RW, et al. Methods for predicting sexual maturity in male cynomolgus macaques on the basis of age, body weight, and histologic evaluation of the testes. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2002, 41(5): 18–20.
- [27] Steiner RA, Bremner WJ. Endocrine correlates of sexual development in the male monkey, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology*, 1981, 109(3): 914–919.
- [28] Shen B, Zhang WS, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 399–402.
- [29] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379.
- [30] Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543–548.
- [31] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015,



- 33(5): 538–542.
- [32] Lin S, Staahl BT, Alla RK, et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 2014, 3: e04766.
- [33] Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*, 2016, 11(1): 118–133.
- [34] Yao X, Wang X, Hu XD, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27(6): 801–814.
- [35] Stauffer WR, Lak A, Yang AM, et al. Dopamine neuron-specific optogenetic stimulation in rhesus macaques. *Cell*, 2016, 166(6): 1564.e6–1571.e6.
- [36] Yang H, Shi LY, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149(3): 605–617.
- [37] Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, et al. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13090–13095.
- [38] Li W, Shuai L, Wan HF, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490(7420): 407–411.
- [39] Sparman ML, Tachibana M, Mitalipov SM. Cloning of non-human primates: the road “less traveled by”. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11/12): 1671–1678.

(本文责编 陈宏宇)

**孙强** 正高级工程师，中国科学院神经科学研究所非人灵长类（苏州）研究平台主任，获中国科学院关键技术“百人计划”支持。孙强博士致力于非人灵长类基因修饰动物模型的构建及技术研发。他领导的团队建立了高效的非人灵长类转基因和基因敲除技术平台；并且开发了食蟹猴精巢异种移植技术，大大缩短了食蟹猴的性成熟周期。作为通讯作者或第一作者在 *Nature*、*Proc Natl Acad Sci USA*、*Cell Res* 等著名学术期刊发表多篇研究论文。其作为通讯作者在 *Nature* 发表的具有自闭症表型的转基因食蟹猴的工作被科技部评为“2016 中国科学十大进展”。

